

WPI Acc No: 86-133838/198621

XRAM Acc No: C86-057215

Naturally derived polysaccharide derivs. - prepd. by reacting natural polysaccharide with chloro-formate cholesterol ester

Patent Assignee: SUNAMOTO J (SUNA-I)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
JP 61069801 A		19860410	JP 84189746	A	19840912		198621 B

Priority Applications (No Type Date): JP 84189746 A 19840912

Language, Pages: JP 61069801 (16)

Abstract (Basic): JP 61069801 A

Polysaccharide derivs. derived from natural polysaccharides of pullulan, amylose, amylopectine, dextran, and mannan are new where sugar units of 0.5-5.0 per 100 sugar units composing the polysaccharides have a prim. hydroxyl gp. at six-position carbon of formula  $\text{-OCH}_2\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NHR}$  (in which R is H or cholesteroxycarbonyl gp. and when R is cholesteroxycarbonyl gp., the sugar unit is 0.5-4.5).

Prepn. comprises reacting natural polysaccharides of pullulan, amylose, amylopectine, dextran, and mannan where sugar units of 0.5-5.0 per 100 sugar units composing the polysaccharides have a prim. hydroxyl gp. at six-position carbon having formula  $\text{-OCH}_2\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NHR}$  with chloroformate cholesterol ester.

USE/ADVANTAGE - Polysaccharides are given biological compatibility and pharmacological and physiological functions. They are partic. useful as material for medical use. Polysaccharide derivs. may be used for coating drug carriers, ribosome microcapsules, red cell ghost, etc., to prevent leaching out of drug contained in the carrier.

International Patent Class (Additional): A61K-009/00; A61K-047/00; C08B-033/04; C08B-035/04; C08B-037/00

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭61-69801

⑪ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和61年(1986)4月10日

C 08 B 37/00  
A 61 K 9/00  
47/00  
C 08 B 33/04  
35/04

7133-4C  
6742-4C  
6742-4C  
7133-4C  
7133-4C

審査請求 未請求 発明の数 2 (全16頁)

⑭ 発明の名称 天然由来多糖誘導体およびその製造方法

⑮ 特 願 昭59-189746

⑯ 出 願 昭59(1984)9月12日

特許法第30条第1項適用 1984年7月13日 日本分析化学会九州支部その他共催の第21回化学関連支部合同九州大会において講演予稿集をもって発表

⑰ 発 明 者 砂 本 順 三 長崎市横尾4-16-10  
⑰ 発 明 者 浜 崎 浩 長崎県北高来郡高来町小江小船津名196  
⑰ 発 明 者 佐 藤 智 典 長崎県南高来郡西有家町須川14  
⑰ 発 明 者 近 藤 寛 樹 長崎市鳴見町24番地62  
⑰ 出 願 人 砂 本 順 三 長崎市横尾4-16-10  
⑰ 代 理 人 弁理士 高木 六郎 外1名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

天然由来多糖誘導体およびその製造方法

## 2. 特許請求の範囲

(1) ブルラン、アミロース、アミロペクテン、デキストランおよびマンナンにおいて、それを構成する糖単位100個あたり0.5～5.0個の糖単位は、その6位炭素における1級水酸基が式



(式中RはHまたはコレステリルオキシカルボニル基を表わす)

によつて示され、かつ該式中Rがコレステリルオキシカルボニル基である場合の糖単位は0.5～4.5個である天然由来多糖誘導体。

(2) ブルラン、アミロース、アミロペクテン、デキストラン、およびマンナンにおいて、それを構成する糖単位100個あたり0.5～5.0個の糖単位は、その6位炭素における1級水酸基が式



によつて示されるものに、クロロ酸エステル

ルエステルを反応させることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の天然由来多糖誘導体の製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

## 発明の目的

本発明は新規な天然由来多糖誘導体およびその製造方法に関するものである。本発明の目的は多糖類に、生体適合性並びに薬理的、生理的機能を賦与することにある。

さらに詳細に述べれば、本発明は特に医用材料として使用されるものであり、例えば医薬品を含む薬物運搬体、なかんずくりボソームマイクロカプセル、マイクロスフェア、赤血球ゴースト等を、本発明による多糖誘導体で被覆し、該薬物運搬体に含まれている医薬品の自然流出抑制および糖残基が有する構造特異性を利用する薬物運搬体の細胞移行効率の向上を目的とするものである。

また本発明はこれら多糖誘導体の生体適合性を利用することにより、種々の人工医用材料をこれ

ら多糖誘導体で被覆して、基材の生体および細胞適合性を向上させるために使用する新規な天然由来多糖誘導体およびその製造方法を開示するものである。

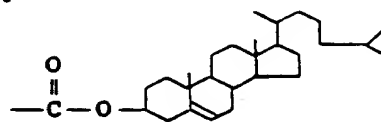
本発明者等は、先に多糖誘導体でリボソームの表面被覆処理を行なうことにより、生理時条件下におけるリボソームの機械的強度を向上せしめ、あるいはこれを生体に投与したときリボソームに特定の臓器指向性を与えることが出来ることを見出した。特願昭56-147587(特開昭58-49311)、特願昭57-82993(特開昭58-201711)、特願昭58-106683参照。すなわち、例えばプルラン、パルミチン酸エステル、アミロペクチン、ステアリン酸エステルのごとき多価脂肪酸エステルをコーティング剤として使用して、リボソームの外表面を被覆すると、生体内において不安定なリボソームが安定化され、その結果内容物(カプセル化物)の洩出が抑制されて薬効が持続されること、あるいはまた血液中に投与されたリボソームが速やかに臓器へ移行し、さ

らに特定の臓器指向性を持つようになることが判明したのである。また、上記コーティング剤の被覆による特定臓器指向性は多糖中の糖残基の化学的性状に依存することも明白にされた。

かかる従来の知見に基づいて、本発明者等は、単にリボソームのみならず、他の薬物運搬体例えばマイクロカプセル、マイクロスフェア、および赤血球ゴースト等をも被覆することができ、該被覆によつて基材の生産適合性を向上させ、かつカプセル仕上げされた物質の洩出抑制効果を高め、さらに多糖質中の糖残基の構造化学的性状に由来する組織指向性を薬物運搬体の表面に賦与することの出来る新規なコーティング剤を提供することとを解決課題として設定し、鋭意探索を試みその結果、本発明の天然由来多糖誘導体の取得に成功し、本発明を完成するに至つた。

以上により明らかなように、本発明の目的は、上記課題の解決であり、本発明は該目的達成のために本発明において特定される新規な天然由来多糖誘導体およびその製造方法を開示するものである。

のごとく示される。ここでさらに本発明の誘導体において、Rがコレステリルオキシカルボニル基である糖単位は0.5~4.5個である。コレステリルオキシカルボニル基は下記の構造式によつて示される。



当該天然由来多糖誘導体の特徴について、さらにマンナンを例にとり具体的に説明すればつぎのごとくである。すなわちマンナンを構成するα-D-マンノピラノース単位について、その100個あたりY個がその単位分子中にアミノエチルアミノカルボニルメチル基



[以後「AECM」と略記する]を有し、さらに該Y個中X個がその単位分子中にコレステリルオキシカルボニルアミノエチルアミノカルボニルメチル基

#### 発明の構成

以下に本発明を詳細に説明する。

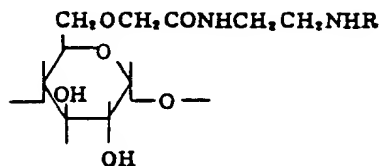
本発明の天然由来多糖誘導体は新規物質である。

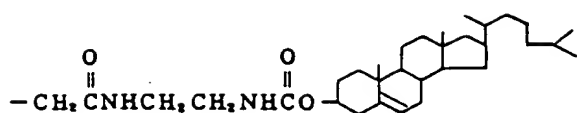
まず、本発明に係る天然由来多糖とはプルラン、アミロース、アミロペクチン、デキストラン、マナンである。本発明の誘導体は、これら多糖において、それを構成する糖単位100個あたり、0.5~5.0個の糖単位がその6位炭素における1級水酸基が式



(式中RはHまたはコレステリルオキシカルボニル基を表わす)

によつて示される。従つて例えばアミロースにおいて、その100個あたり0.5~5.0個の糖単位は





〔以後「AECM-Chol」と略記する〕を有するものであるとすると、本発明におけるマンナン誘導体はYが0.5～5.0の範囲にあり、Xが0.5～4.5の範囲にある物質であるということが出来る。

物質の特定にあたりY (AECM値と呼ぶ)は、以下のようにして求める。まず、本発明の天然由来多糖誘導体を、脱コレステロール化してアミノエチルアミノカルボニルメチルマンナン塩酸塩とし、つぎにこれの元素分析値より次式に従つてYを求める。

$$\frac{N}{C} = \frac{28Y}{7200 + 48Y} \quad \text{式(1)}$$

ここでNは窒素含有百分率およびCは炭素含有百分率を表わす。

が、例えば概略次のようにおこなえばよい。

天然由来多糖に、モノクロル酢酸ナトリウムを反応せしめてカルボキシメチル多糖のナトリウム塩 (CM-多糖) を得る。これにエチレンジアミン塩酸塩を反応せしめてアミノエチルアミノカルボニルメチル多糖塩酸塩 (AECM-多糖) を得る。次にこれを無水DMSOに溶解し、これに無水DMFに溶解したクロル酢酸コレステリルエステルを加え、ピリジンを滴下して反応させれば目的物 (Chol-AECM-多糖) を得る。

AECM-Chol基を有するに至る糖単位についてその反応工程を示せば以下のごとくである。式中、Rはコレステリルオキシカルボニル基を表わす。

またX (コレステロール置換価と呼ぶ)は、先ず、本発明物質について100MHz  $^1\text{H-NMR}$ を測定し、 $\delta$  2.6-6 ppmの範囲に現れる多糖部分のプロトン数  $H_{ps}$  と、 $\delta$  2.4-0.2 ppmの範囲に現れるコレステロール部分のプロトン数 ( $H_{chol}$ ) との比より次式に従つて糖単位を100個あたりに換算した個数として求める。

$$\frac{H_{ps}}{H_{chol}} = \frac{93X + 1000}{43 X} \quad \text{式(2)}$$

該天然由来多糖誘導体は以下のように表示する。

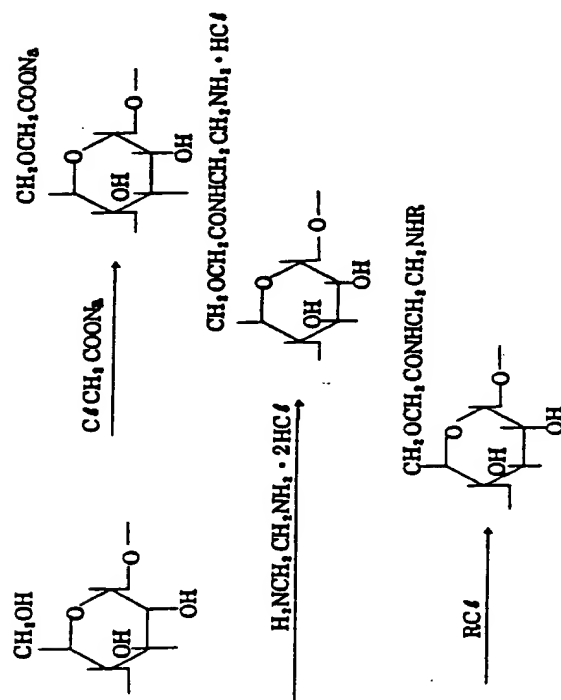
$$\text{Chol}(X) - \text{AECM}(Y) - \text{多糖名} \left( \frac{\text{平均分子量}}{1000} \right)$$

従つて例えば100グルコース当り1.3個のコレステロール基と、1.8個のAECM基とが置換した平均分子量50,000のプルランは、

$$\text{Chol}(1.3) - \text{AECM}(1.8) - \text{pullulan}(50)$$

と表示する。

本発明の物質は、天然由来多糖を出発物質として従来公知の方法によつて製造することができる



以下、添付図面について説明する。

図1及び2はChol(1.3)-AECM(1.8)-Pullulan(50)の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル及びIRスペクトルである。

図3及び4はChol(1.4)-AECM(1.4)-dextran(176)の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル及びIRスペクトルである。

図5及び6はChol(1.0)-AECM(1.4)-amylopectin(112)の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル及びIRスペクトルである。

図7及び8はChol(2.4)-AECM(3.0)-mannan(200)の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル及びIRスペクトルである。

図9及び10はChol(2.0)-AECM(3.3)-amylose(85)の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル及びIRスペクトルである。

図11はFITC置換修飾多糖で被覆したリボソームの流出曲線である。

図12は多糖被覆1枚膜リボソームからのCFの漏出曲線である。

定して、 $1740\text{ cm}^{-1}$ にカルボニル基の吸収を確認した。

濃縮液を蒸留水で15mlに希釈し、マグネチック・スターラー上で攪拌しつつ、エチレンジアミン二塩塩塩0.74g ( $5.56 \times 10^{-3}\text{ mol}$ ) および縮合剤として1-エチル-3-(3-ジメチルアミノ)プロピルカルボジイミド塩酸塩(以下EDC塩酸塩と称する)0.21g ( $1.10 \times 10^{-3}\text{ mol}$ )を加え、1N-塩酸と、1N-水酸化ナトリウムとでpH4.7に調節した。これを25℃で、7時間攪拌後、透析チューブ中に移し、0.2M-塩化ナトリウム水溶液に対し4日間、ついで蒸留水に対し1日透析し、凍結乾燥した。収量0.93g。

生成物を少量の蒸留水に溶かし、濾紙にスポットして、乾燥し、紫〜赤紫色のニンヒドリン発色によりアミノ基の存在を確認した。

糖単位100個当りのAECM基の導入量(Y)は、元素分析に依る窒素原子の質量割合から算出した。

元素分析値(%)は次のとおりであつた。

図13は多糖被覆リボソームのConAによる凝集曲線である。

#### 実施例1 Chol(1.3)-AECM(1.8)-Pullulan(50)の合成

50mlのナス型フラスコ中でプルラン(MW-50000)1.0g ( $10/162 = 6.2 \times 10^{-3}\text{ mol}$  糖単位)を1.35M-モノクロロ酢酸ナトリウム水溶液18.5mlに溶解した。マグネチック・スターラー上で攪拌しつつ、10N-水酸化ナトリウム5.0mlを加え、蒸留水で50mlに希釈した。この時、該溶液は、0.5M-モノクロロ酢酸ナトリウム、1N-水酸化ナトリウム溶液となつている。これを25℃で7時間保ち反応させた。その後1M-リン酸二水素ナトリウム5mlを加え、ついで5N-塩酸でpH7に調節して反応を停止させた。透析チューブ(Visking)に移し、トルエン飽和水溶液に対し4日、ついで蒸留水に対し1日透析した。これをナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレーターで10mlに濃縮して次の反応に用いた。

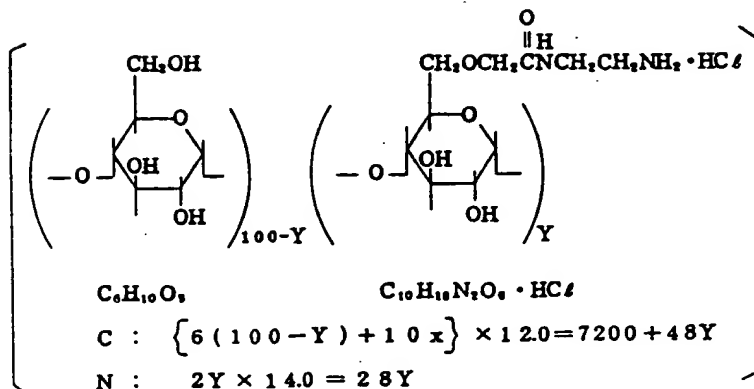
少量の酸性濃縮液からの凍結乾燥物のIRを測

H	C	N
655	38.63	0.26

$$\text{したがって、} \frac{7200 + 48Y}{28Y} = \frac{38.63(\text{C}\%)}{0.26(\text{N}\%)}$$

よつて、 $Y = 1.75$ である。

このものをAECM(1.3)-Pullulan(50)と称する。



AECM(1.3)-Pullulan(50) 0.84g ( $5.18 \times 10^{-3}\text{ mol}$  糖単位)を、塩化カルシウム管付の逆流冷却

管を備えた50 mlのナス型フラスコ中に入れ、無水DMSOの14 mlを加え、油浴中70~80℃で加熱溶解させた。ついで無水ピリジン3 mlを加えた後、無水DMFの4 mlに溶解し、コレステリルクロホルメイトの0.91 g ( $2.02 \times 10^{-3}$  mol)を加えた。70~80℃で7時間保つた後、放冷し、エタノールを加えて多糖を沈殿させた。多糖を分別し、遊離のコレステロールを除く為に、エタノールさらにエーテルで十分洗浄した。これを少量の水に溶かし凍結乾燥した。収量0.70 g (原料Pullulanからの収率78%)

糖単位100個当りのコレステロールの導入量(X)は、 $^1\text{H-NMR}$ における多糖と、コレステロールとのプロトン積分比より算出した。多糖とコレステロールとのプロトン比は

$$\frac{H_{ps}(826 \sim 6)}{H_{cho}(824 \sim 0.2)} = \frac{9X + 1000}{43X}$$

として表わされるから、

$$\text{測定値} = \frac{H_{ps}}{H_{cho}} = \frac{167.5}{9.50}$$

より、 $X = 1.33$ と求めた。

これをChol(1.3)-AECM(1.8)-Pullulan(50)と称する。

このものの $^1\text{H-NMR}$ を図1に、またIRを図2にそれぞれ示す。

#### 実施例2 Chol(1.4)-AECM(1.4)-dextran(176)の合成

実施例1と同様の操作で行った。反応条件と結果のみを流れ図的に示す。

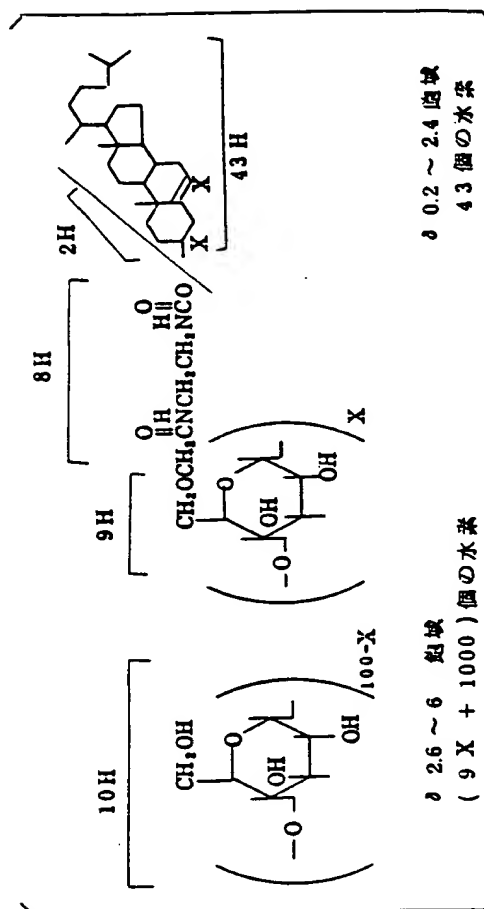
デキストラン ( $\overline{MW}=176000$ ) 1.0 g ( $6.17 \times 10^{-3}$  mol糖単位)  
1.35M-モノクロ酢酸ナトリウム水溶液 18.5 ml  
10N-水酸化ナトリウム 5.0 ml

50 mlに希釈 (0.5 M-モノクロ酢酸ナトリウム)  
1N-水酸化ナトリウム

25℃で、7時間反応

中性にして透析

減圧濃縮 (約10 ml)



上記の濃縮液を15 mlに希釈、  
エチレンジアミン二塩酸塩、0.74 g ( $5.56 \times 10^{-3}$  mol)  
EDC塩酸塩、0.21 g ( $1.10 \times 10^{-3}$  mol)

pH 4.7  
25℃で、7時間反応

透析

凍結乾燥

AECM(1.4)-dextran(176)  
収量0.91 g

元素分析値(%)

H	C	N
5.88	36.37	0.20
$\frac{C}{N} = \frac{7200 + 48Y}{28Y} = \frac{36.37}{0.20}$		

より  $Y = 1.43$ 、AECM基の導入量1.4。

AECM(1.4)-dextran(176) 0.27 g ( $4.44 \times 10^{-3}$  mol糖単位)

無水DMSO  
14 ml

コレステリルクロホルメイト 0.80 g ( $1.78 \times 10^{-3}$  mol) / 無水DMF 3 ml

無水ピリジン 3 ml

70~80℃、7時間反応

エタノール 添加

濾過 (エタノール、エーテルで洗浄)

少量の水にとかし、凍結乾燥

収量 0.69 g (全行程の収率 87%)

最終生成物の  $^1\text{H-NMR}$  を図 3 に、又 IR を図 4 にそれぞれ示す。

$$\frac{H_{ps}}{H_{chol}} = \frac{9X + 1000}{43X} = \frac{1625}{950}$$

より  $X = 1.37$  で糖単位 100 個当りのコレステロールの導入量は 1.4 個であつた。

実施例 3  $\text{Chol}(1.0)\text{-AECM}(1.4)\text{-amylopectin}(112)$  の合成

アミロペクチン ( $\text{MW. } 112000$ ) 1.0 g ( $6.17 \times 10^{-3}$  mol 糖単位)  
1.35M-モノクロロ酢酸ナトリウム水溶液 18.5 ml  
10N-水酸化ナトリウム 5.0 ml

50 ml に希釈 (0.5M-モノクロロ酢酸ナトリウム  
1N-水酸化ナトリウム)

25℃で、7時間反応

中性にして透析

減圧濃縮 (約 10 ml)

上記の濃縮液を 15 ml に希釈、  
エチレンジアミン二塩酸塩 0.74 g ( $5.56 \times 10^{-3}$  mol)  
EDC 塩酸塩 0.21 g ( $1.10 \times 10^{-3}$  mol)

pH 4.7

25℃で、7時間反応

透析

凍結乾燥

AECM(1.4)-amylopectin  
(112) 収量 0.75 g

元素分析値 (%):  $\frac{H}{5.76} \quad \frac{C}{37.84} \quad \frac{N}{0.21}$

したがって、

$$\frac{C}{N} = \frac{7200 + 48Y}{28Y} = \frac{37.84}{0.21}$$

$Y = 1.44$  で、AECM 基の導入量は、糖単位 100 個当り 1.4 個であつた。

AECM(1.4)-amylopectin(112) 0.54 g ( $3.33 \times 10^{-3}$  mol 糖単位)

無水DMSO 14 ml

コレステリルクロホルメイト 0.60 g ( $1.33 \times 10^{-3}$  mol)

無水DMF 4 ml

無水ピリジン 3 ml

70~80℃で、7時間

エタノール 添加

濾過 (エタノール、エーテルで洗浄)

少量の水にとかし、凍結乾燥

収量 0.46 g (全行程の収率 64%)

最終生成物の  $^1\text{H-NMR}$  を図 5 に、又 IR を図 6 にそれぞれ示した。  $^1\text{H-NMR}$  から

$$\frac{H_{ps}}{H_{chol}} = \frac{9X + 1000}{43X} = \frac{1950}{85}$$

$X = 1.02$  となり、糖単位 100 個当りのコレステロールの導入量は 1.0 個であつた。

実施例 4  $\text{Chol}(2.4)\text{-AECM}(3.0)\text{-mannan}(200)$  の合成

マンナン ( $\text{MW } 200000$ ) 0.50 g ( $3.09 \times 10^{-3}$  mol 糖単位)

1.35M-モノクロロ酢酸ナトリウム水溶液 9.3 ml

10N-水酸化ナトリウム 2.5 ml

25 ml に希釈

25℃で、7時間反応

中性として透析

凍結乾燥

AECM(3.0)-mannan(200)  
収量 0.43 g

カルボメトキシ化マンナン ( $\text{MW } 200000$ )

0.40 g ( $2.4 \times 10^{-3}$  mol 糖単位) / 蒸留水 5 ml

エチレンジアミン二塩酸塩 0.33 g ( $2.48 \times 10^{-3}$  mol)

EDC 塩酸塩 0.10 g ( $5.20 \times 10^{-4}$  mol)

pH 4.7

25℃で、9時間反応

透析  
凍結乾燥 収量 0.36g

元素分析値(%):  $\frac{H}{6.03} \quad \frac{C}{38.37} \quad \frac{N}{0.44}$

したがって、

$$\frac{C}{N} = \frac{7200 + 48Y}{28Y} = \frac{38.37}{0.44}$$

$Y = 3.0$ 、よつて糖単位 100 個当りの AECEM 基の導入量 3.0 個。

AECEM(3.0)-mannan(200) 0.32g ( $1.97 \times 10^{-3}$  mol 糖単位)  
無水DMSO 8ml  
コレステリルクロロホルメイト 0.070g ( $1.56 \times 10^{-4}$  mol)  
無水DMF 1 ml  
無水ビリジン 1 ml  
45~55℃で、12時間反応  
エタノールを添加  
ろ過 (エタノール、エーテルで洗浄)

上記の濃縮液 (8 ml)  
エチレンジアミン二塩酸塩 0.41g ( $3.08 \times 10^{-3}$  mol)  
EDC 塩酸塩 0.10g ( $5.21 \times 10^{-4}$  mol)  
pH 4.7  
透析  
凍結乾燥 AECEM(3.3)-amylose(85)  
収量 0.45g

元素分析値(%):

$\frac{H}{6.28} \quad \frac{C}{39.61} \quad \frac{N}{0.49}$

より AECEM 基の導入量は 3.3 個であつた。

$$\frac{N}{C} = \frac{7200 + 48Y}{28Y} = \frac{39.61}{0.49}, \quad Y = 3.25$$

AECEM(3.3)-amylose(85) 0.34g ( $2.10 \times 10^{-3}$  mol 糖単位)  
無水DMSO 8 ml  
コレステリルクロロホルメイト 0.94g ( $2.09 \times 10^{-3}$  mol)  
無水DMF 4 ml  
無水ビリジン 2 ml  
70~80℃で、8時間反応  
エタノールを添加

少量の水にとかし、凍結乾燥

収量 0.26g (全行程の収率 73%)

最終生成物の  $^1H$ -NMR を図 7 に、又 IR を図 8 にそれぞれ示す。 $^1H$ -NMR より、

$$\frac{H_{ps}}{H_{cho}} = \frac{9X + 1000}{43X} = \frac{158.5}{16.2}$$

$X = 2.43$  で、コレステロールの導入量は 2.4 個であつた。

実施例 5 Chos(2.0)-AECEM(3.3)-Amylose の合成

アミロース (MW: 85000) 0.50g ( $3.09 \times 10^{-3}$  mol 糖単位)  
1.35M-モノクロロ酢酸ナトリウム 9.3 ml  
10N-水酸化ナトリウム 2.5 ml  
25 ml に希釈  
25℃で、7時間反応  
中性として透析  
減圧濃縮 (約 8 ml)

ろ過 (エタノール、エーテル洗浄)  
減圧乾燥

収量 0.26g (全行程の収率 69%)

最終生成物の  $^1H$ -NMR を図 9 に、又 IR を図 10 にそれぞれ示した。

$^1H$ -NMR より、コレステロールの糖単位 100 個当りの導入量は 2.0 個であつた。

$$\frac{H_{ps}}{H_{cho}} = \frac{1000 + 9X}{43X} = \frac{166.0}{14.4}, \quad X = 2.04$$

発明の効果

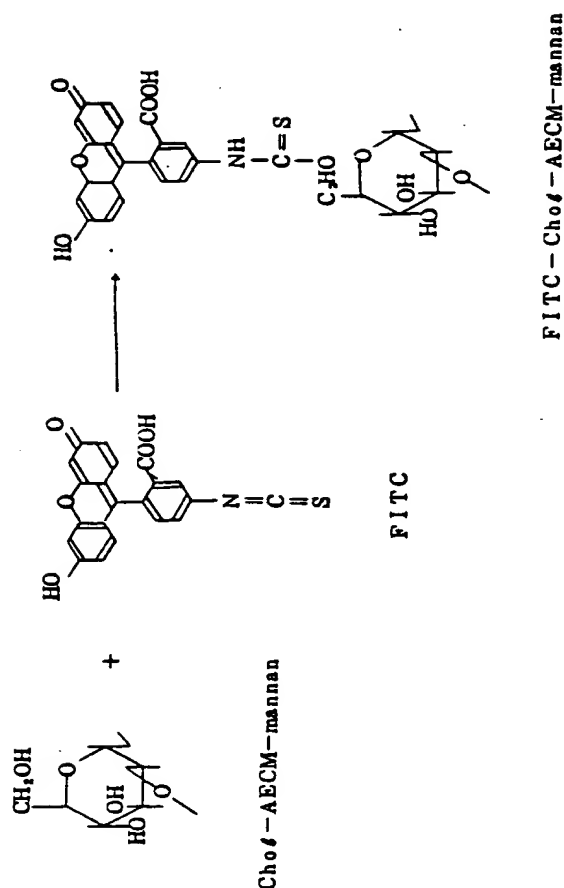
本発明の目的の項において述べたごとく、本発明物質によりリボソームを被覆することができる。該被覆により、リボソーム中にカプセル化された水溶性内容物質の洩出抑制能が発現され、さらにリボソーム表面での糖残基の化学的性状に基づく新たな機能を賦与することができる。以下の実施例によつて本発明の効果を説明する。



### 実験例 1 蛍光プローブ (FITC) 修飾多糖を用いたリボソーム被覆の確認と被覆効率の測定

蛍光プローブである FITC [フルオレッゼイン・イソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate)] で修飾した多糖を用いて、リボソームを被覆し、そのゲル透過における流出パターンから被覆の確認を行った。また FITC の蛍光強度から FITC の濃度を求め、これより脂質に対する多糖の量を算出して被覆効率を求めた。代表例としてマンナン誘導体についての実験結果の詳細を以下に述べる。

FITC 修飾マンナン誘導体 [FITC (18)-Chol (3.2)-AECM (4.4)-mannan (200)] の合成は下式の反応に従って行なつた。



即ち、Chol (3.2)-AECM (4.4)-mannan (200) の 2.9 mg を無水 DMSO の 1 ml に溶解し、ピリジンの 2 滴、FITC の 9 mg、および触媒としてのジ-n-ブチル錫ジラウリル酸エステル 3 滴を加え、80~85℃で 2 時間反応させた。放冷後、エタノール 10 ml を加え、生じた黄色沈殿を採取した。遊離の FITC がシリカゲル薄層クロマトグラフィーで確認できなくなるまでエタノールで洗浄後、減圧乾燥した。収量 2.8 mg。

FITC の糖単位 100 個当りの導入量は、FITC の特性吸収である 490 nm の吸光度から 18 個と定めた。FITC のモル吸光係数は緩衝液 (20 mM-Tris、200 mM-NaCl pH 8.6) 中  $\epsilon_{490}(25^\circ\text{C}) = 62600$  であつた。

他方、卵黄レシチン 30 mg より常法に従い薄膜を形成した。緩衝液 (20 mM-Tris、200 mM-NaCl、pH 8.6) 4 ml を加えてボルテックスミキサーを使い薄膜を剥がし、ついで超音波処理を行った。これに FITC (18)-Chol (3.2)-AECM (4.4)-mannan (200) 10 mg の 1 ml 緩衝溶液を加

加、20℃で 1 時間マグネチック・スターラー上で攪拌し、リボソームを被覆した。このものをセファロース 4 B カラムでゲル透過し、各フラクションについて 360 nm でリボソームの濁り度と、490 nm における FITC 基由来の吸光度を測定して流出曲線を作成した (図 11)。

修飾多糖 [Chol-AECM-mannan (200)] によるリボソームの被覆は、リボソーム流出フラクションでの FITC 基の存在から確認できた。実験の結果、AECM-Chol 基を置換していないマンナンではリボソームを被覆することは出来ないが、本発明物質では被覆しうる事が判明した。

### 実験例 2 リボソームからの蛍光プローブ (CF) の漏出抑制効果

多糖被覆リボソームの膜透過抑制 (バリアー能向上) を検討するため、リボソーム内水相に蛍光プローブとしてカルボキシフルオレッゼイン (CF) を取り込ませ、リボソーム内容物の漏出を測定した。

CF は 10 mM 以上では温度消光し、蛍光を発し

ないことを利用し、200 mMのCFをリボソーム内水相に取り込ませ、リボソームから漏出して、外液で希釈され発光を発したCFの発光強度の経時変化を測定した。

修飾多糖類によるリボソームの被覆は、実験例1の方法に従った。即ち、卵黄レシチン30 mgを用いて常法に従い50 ml容量型フラスコ中薄膜を形成させた。これに200 mM-CF緩衝液4 mlとガラスビーズ数ヶを加え常法に従い、ボルテックシング・ソニケーション、ゲルが過を行ないCF内包リボソームを得た。

修飾多糖類によるリボソームの被覆は、リン脂質に対して一定重量比で行なつた。

CFの洩出は50℃において492 nmでの励起による520 nmの発光を測定して追跡した。蛍光セルに緩衝液(20 mM-Tris 200 mM-NaCl、pH 8.6)1 mlを入れ、セルホルダーにセットし、5分後CF内包リボソーム溶液の適量を添加し、10分間所定温度でインキュベートし、そのときを、 $t=0$ として5分間隔で30～40分間強度

増加を測定した。

セル中の脂質濃度は $1.0 \times 10^{-4}$  Mに統一した。経時変化測定後は、トリトンX-100の10(1/100)%水溶液30 mlをセル中に添加し、リボソームを破壊した。この時の発光強度を $I_{\infty}$ とした。

リボソームからのCFの漏出は洩出%で示し、下式から求めた。

$$\text{洩出\%} = \frac{I_t - I_0}{I_{\infty} - I_0} \times 100 \quad (\%)$$

比較した結果を図12に示す。

### 実験例 3 多糖被覆リボソームと大豆レクチン (concanavalin A) との相互作用

大豆レクチンであるコンカナバリンAは、動物の赤血球を凝集させたり、グリコーゲンやマンナンのような多糖類と沈殿を形成する。従来、非還元性糖末端にグルコース、マンノース、フルクトース単位を持つ多糖がコンカナバリンAと相互作用を持つことが知られており、この反応は特異的定量的である。そこで合成したコレステロール修飾多糖被覆リボソームと、コンカナバリンAとの

相互作用を調べることによりコレステロール修飾多糖の結合特異性を検討した。

相互作用の結果である凝集は360 nmにおける濁り度により測定した。多糖被覆リボソーム溶液(脂質濃度として $4.0 \times 10^{-4}$  M)2.7 mlをUVセルに採取し、恒温槽を25℃に調節したセルホルダーにセットした。そして10分後、コンカナバリンA 400  $\mu$ g/200  $\mu$ l 緩衝液(20 mM-Tris、200 mM-NaCl、pH 7.2)を添加し、濁り度の経時変化を測定した。図13に結果を示す。

アミロペクテン、マンナン誘導体で被覆したリボソームは、大きな凝集効果を示している。これは、つまりアミロペクテン及びマンナンにおいてはコンカナバリンAと結合する糖残基の数が多く、薬物運搬体として生体投与時においても生体組織との特異的結合の可能性が高いことを暗示している。

#### 4. 図面の簡単な説明

図1、3、5、7及び9は本発明の天然由来多糖誘導体の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。

図2、4、6、8及び10は本発明の天然由来多糖誘導体のIRスペクトルを示す。

図11、12及び13は被覆リボソームの流出曲線、漏出曲線及び凝集曲線である。

特 許 出 願 人 砂 本 順 三

代理人 高 木 六 郎

代理人 高 木 文 生

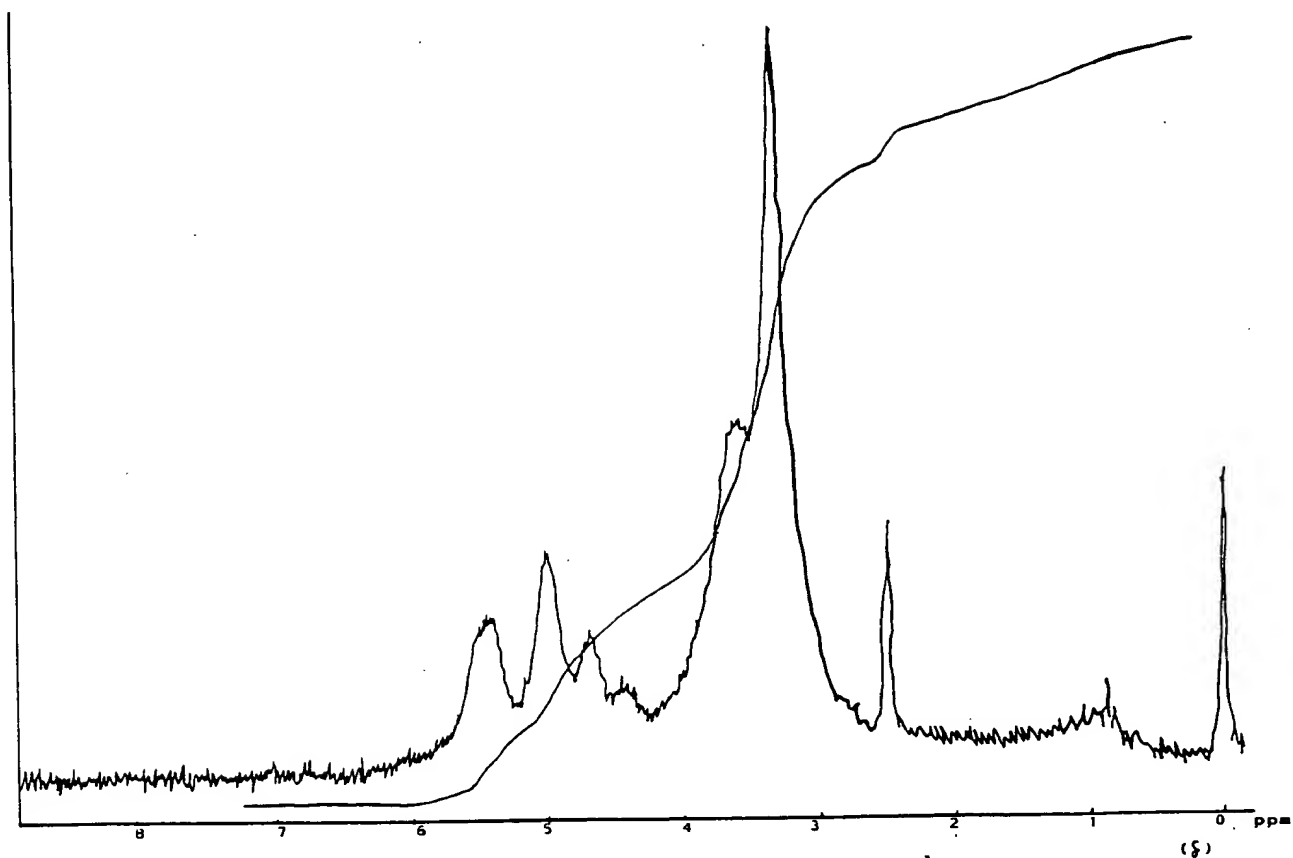


図1. Chol(1.3)-AECM(1.8)-Pullulan(50) の $^1\text{H}$ -NMR スペクトル

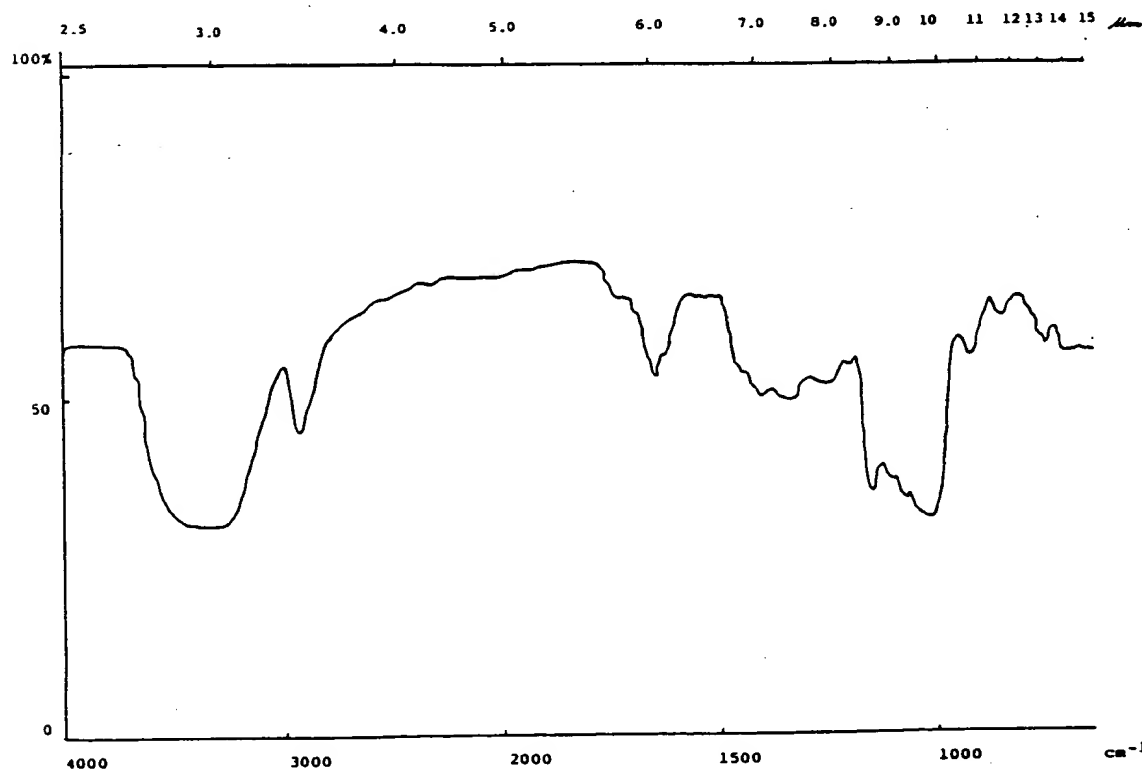


図2. Chol(1.3)-AECM(1.8)-Pullulan(50) のIR スペクトル

(KBr)

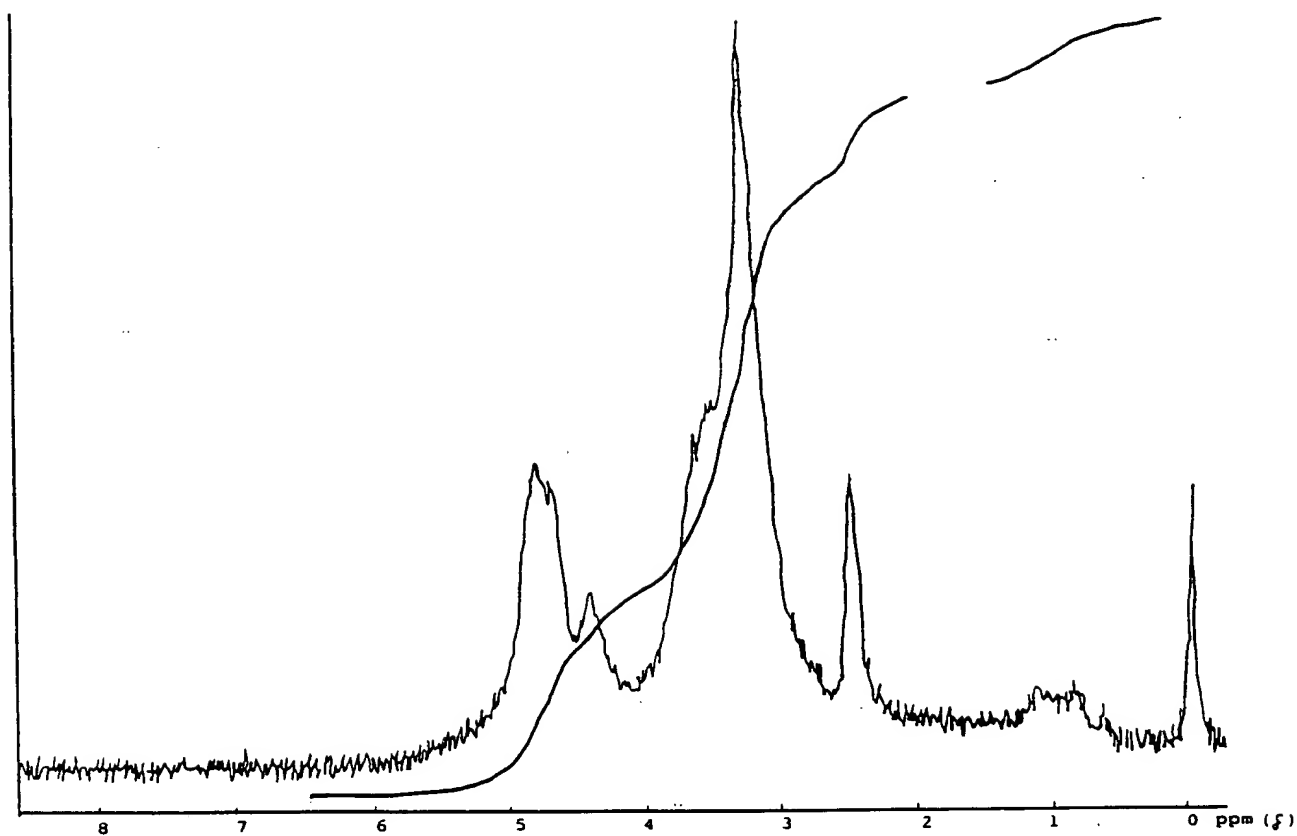


図 3. Chol(1.4)-AECM(1.4)-dextran(176) の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル

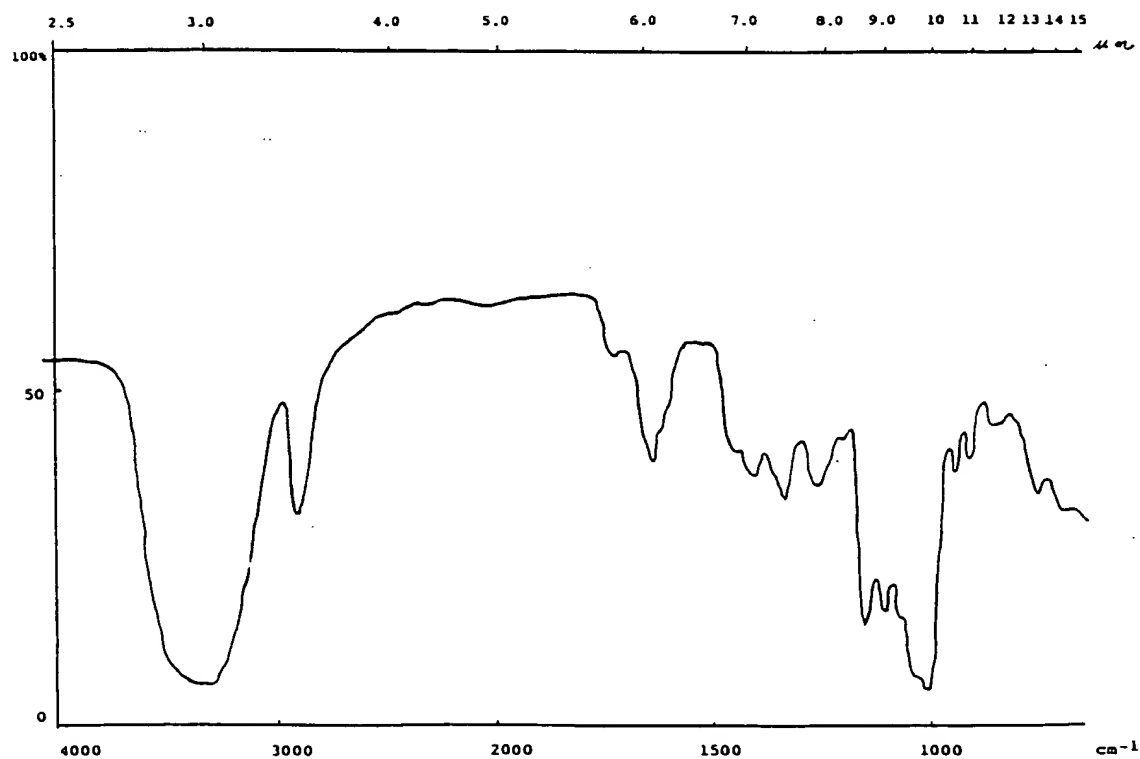


図 4. Chol(1.4)-AECM(1.4)-dextran(176) の IR スペクトル (KBr)

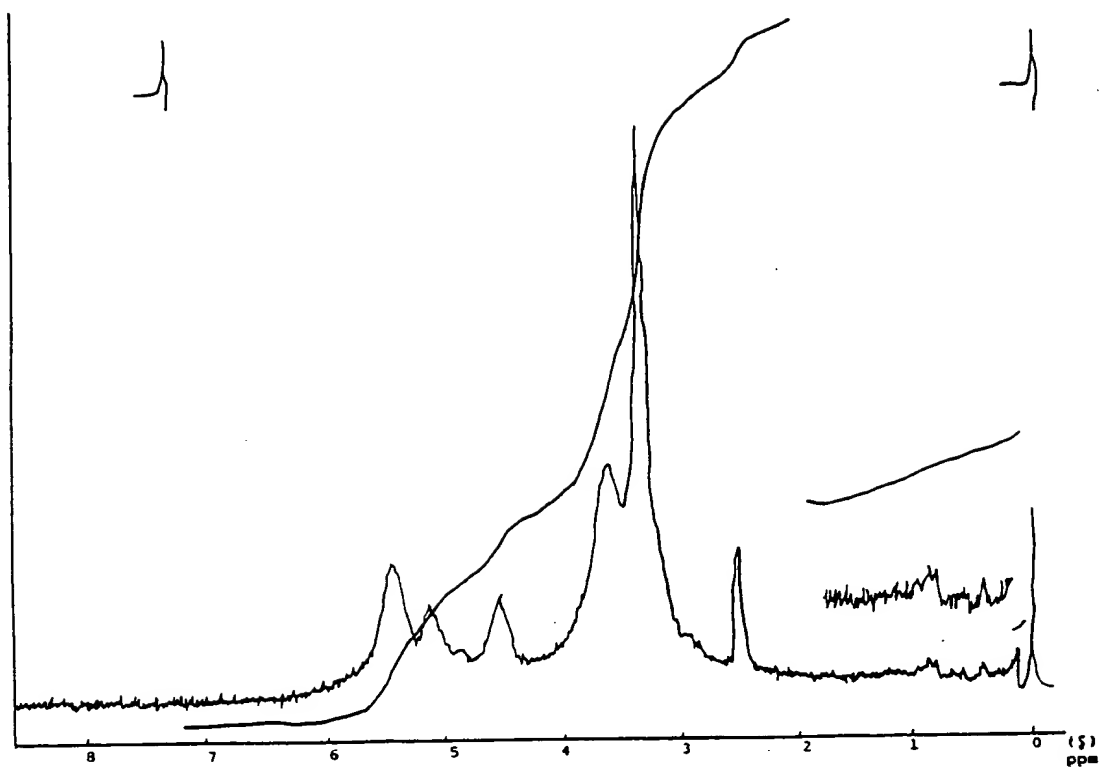


図5. Chol(1.0)-AECH(1.4)-amylopectin(112)の $^1\text{H-NMR}$  スペクトル

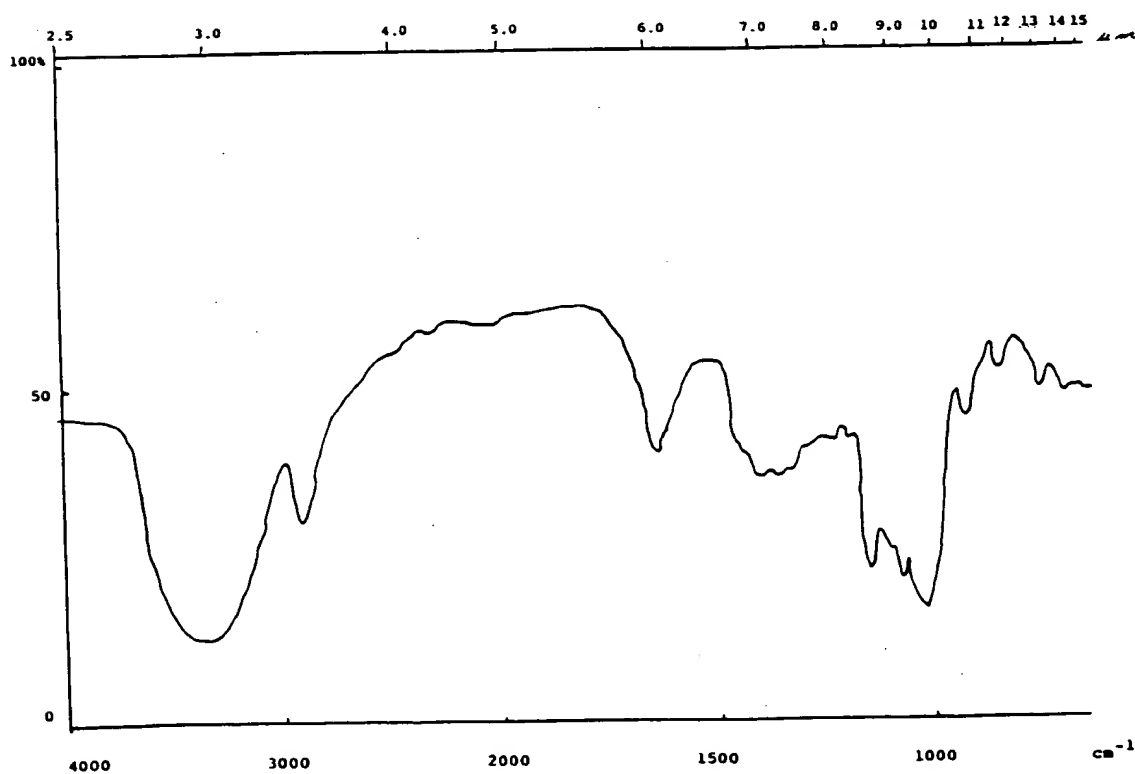


図6. Chol(1.0)-AECH(1.4)-amylopectin(112)のIR スペクトル (KBr)

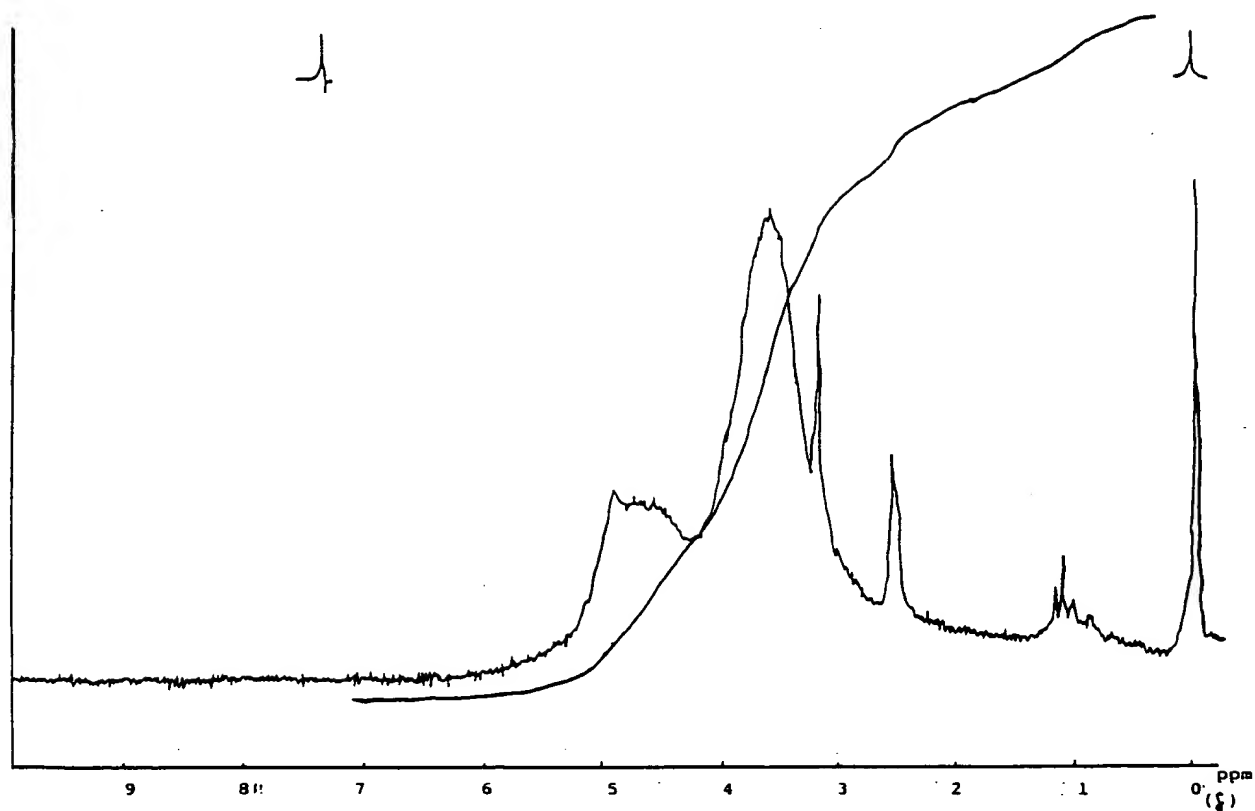


図7. Chol(2.4)-AECM(3.0)-mannan(200) の $^1\text{H}$ -NMR スペクトル

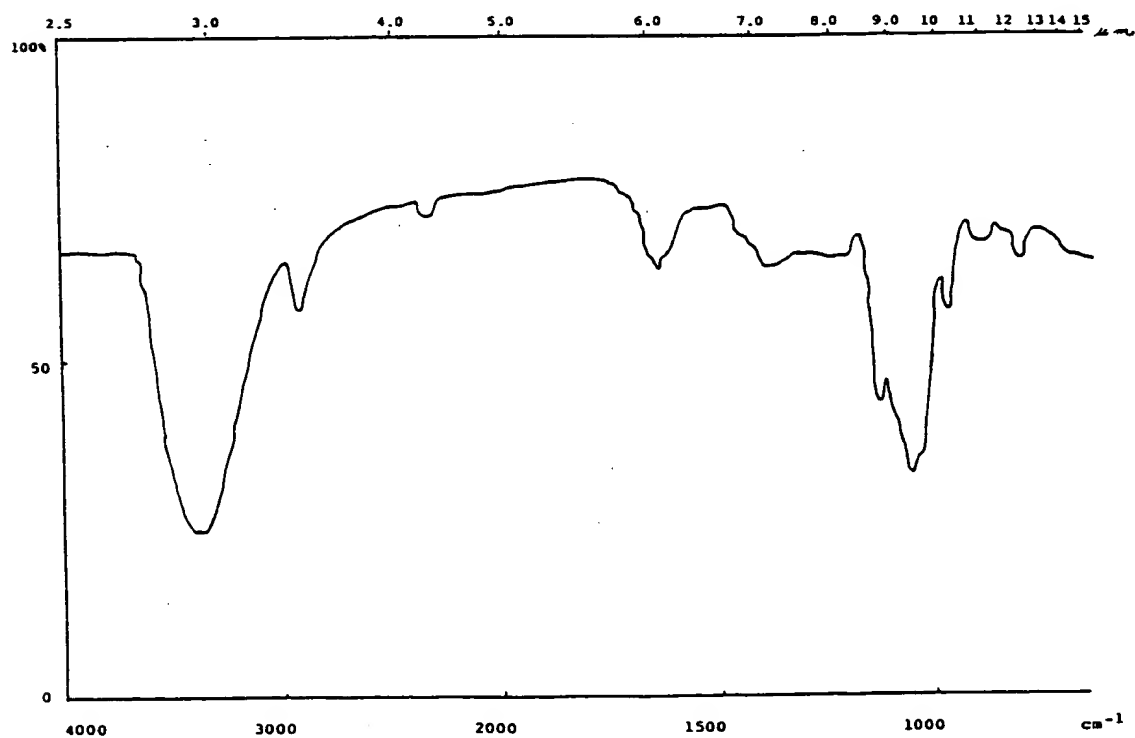


図8. Chol(2.4)-AECM(3.0)-mannan(200) のIR スペクトル(KBr)

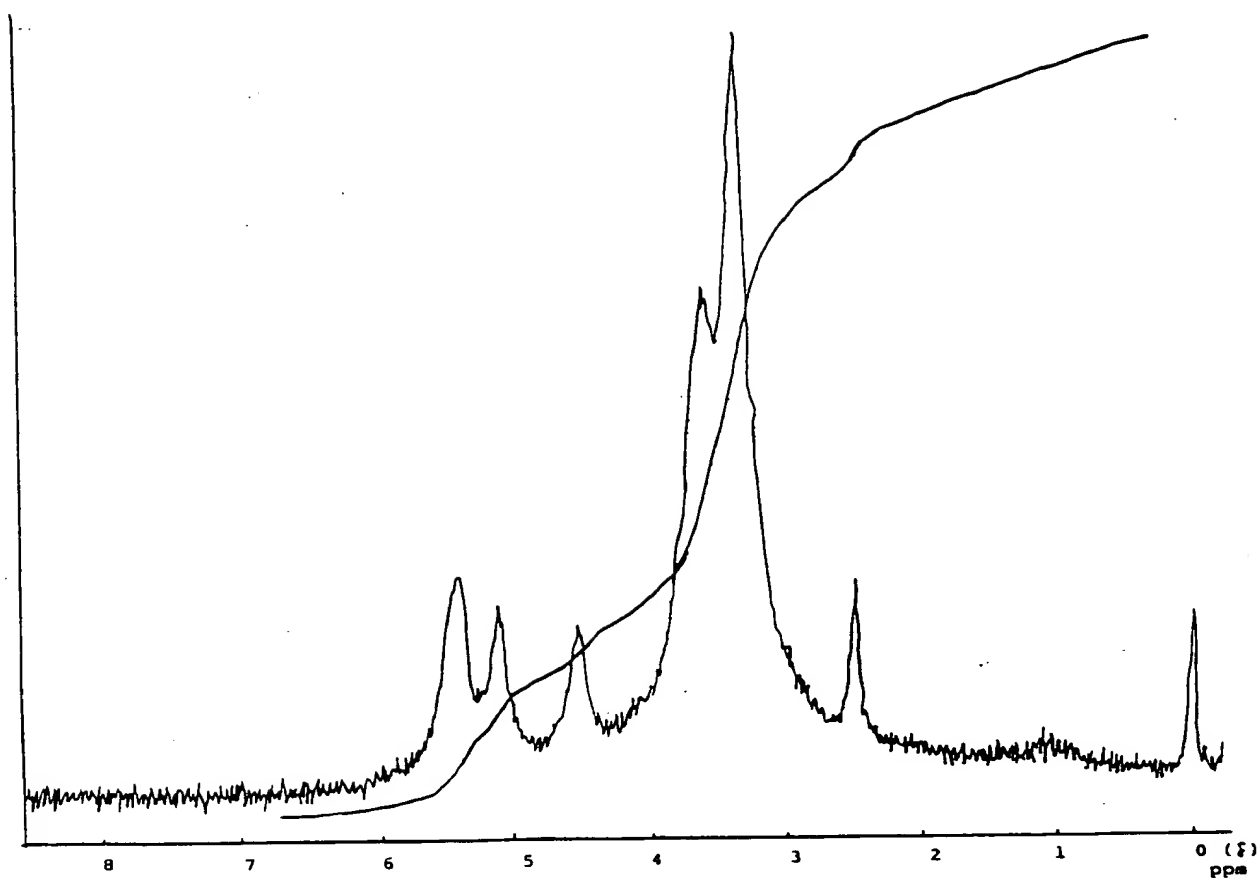


図 9. Chol(2.0)-AECM(3.3)-amylose(85)の $^1\text{H}$ -NMR スペクトル

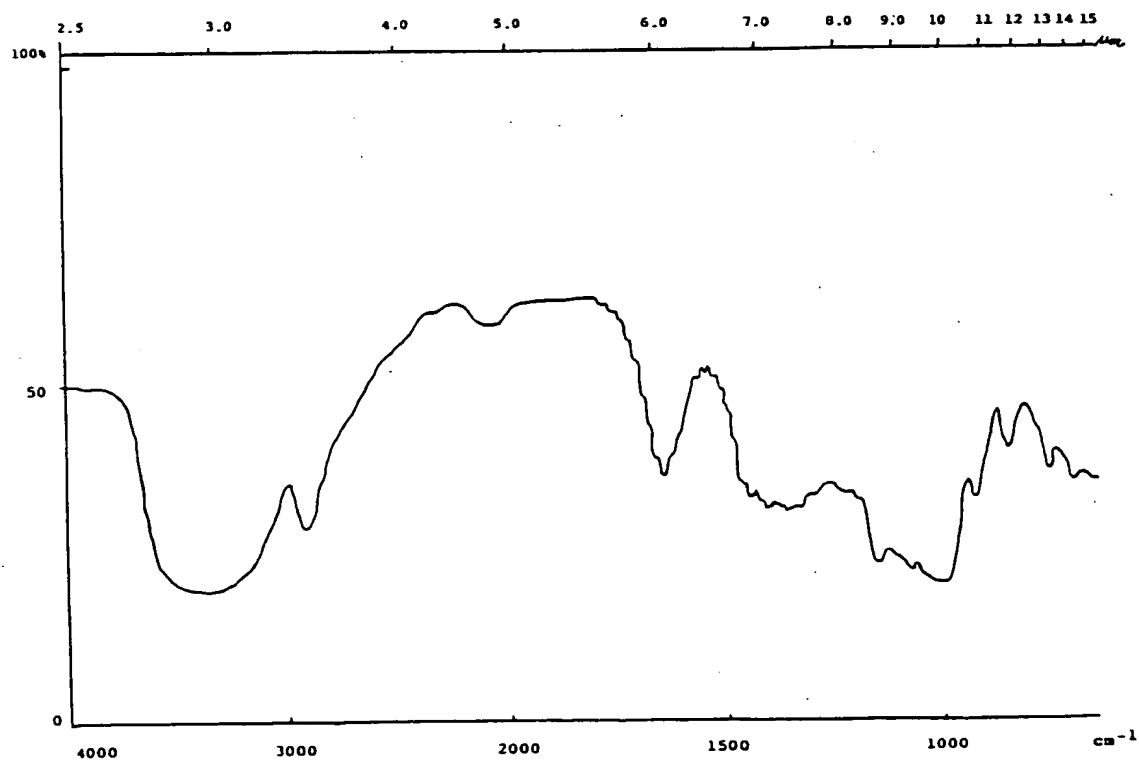


図 10. Chol(2.0)-AECM(3.3)-amylose(85) の IR スペクトル (KBr)

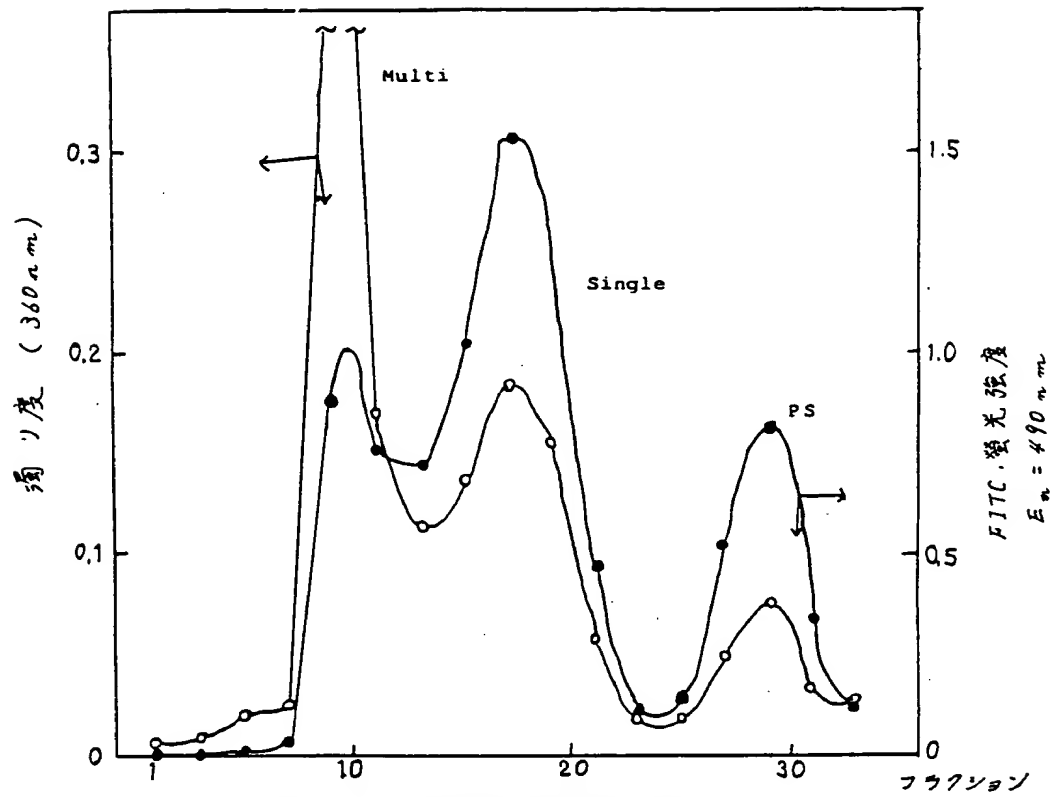


図 11. FITC置換修飾多糖で被覆した  
リボソームの流出曲線(セファロース4Bカラム)

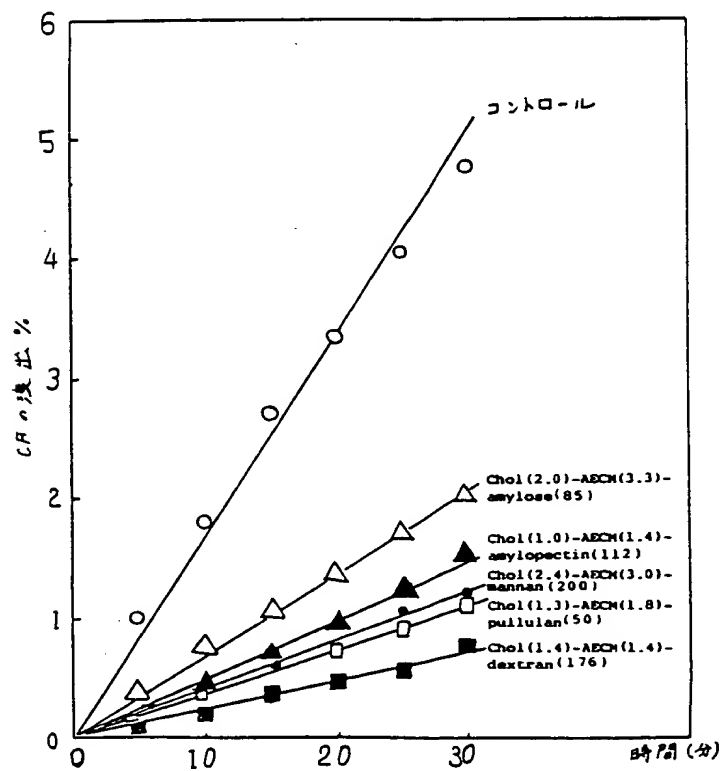


図 12. 多糖被覆1枚膜リボソームからの  
CFの漏出



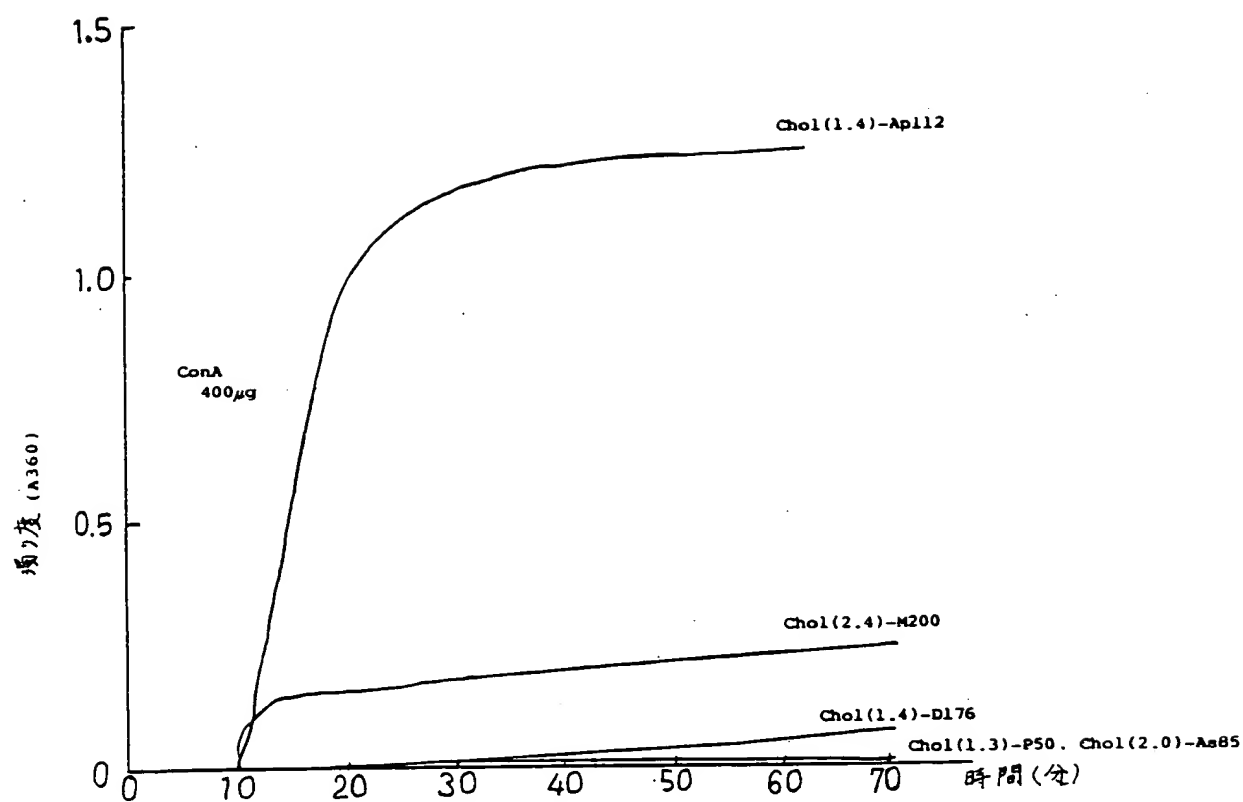


図13. 多糖被覆リボソームのConAによる凝集